

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-123985

(43)Date of publication of application : 16.05.1995

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 1/21
//C12N 1/21
C12R 1:19)

(21)Application number : 05-279349

(71)Applicant : YAMAGUCHI MASAYOSHI
DAI ICHI PURE CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 09.11.1993

(72)Inventor : YAMAGUCHI MASAYOSHI

(54) DNA FRAGMENT CODING FOR REGUCALCIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a DNA fragment coding for regucalcin derived from a hepatocellular cytoplasm and fulfilling the role as a control factor in a intracellular informational transmitting system with Ca²⁺ and mass-producing the regucalcin useful as a reagent for research and a clinical testing agent.

CONSTITUTION: This new DNA fragment coding for regucalcin derived from a hepatocellular cytoplasm is expressed by an amino acid sequence represented by the formula. The DNA fragment is obtained by extracting a liver from a Wistar strain male rat, recovering an mRNA according to a guanidinium thiocyanate method, passing, the resultant recovered mRNA through an oligo (dT) cellulosic column, separating the mRNA, reacting a reverse transcriptase therewith, synthesizing a cDNA, then preparing a cDNA library according to a conventional method, screening the prepared library with an antiregucalcin antibody, recovering a DNA from a positive clone and treating the obtained DNA with a restriction enzyme. Thereby, the regucalcin can be mass-produced by a transformant cell containing the DNA fragment.

Met Ser Ser Ile Lys Lys Glu Lys Val Leu Arg Glu Asn Tyr Arg Cys
5 14 19
Gly Glu Ser Phe Tyr Trp Glu Lys Ala Ser Lys Lys Leu Lys Thr Val
20 25 30
Asp Ile Pro Ser Lys Thr Val Cys Arg Trp Asp Ser Ile Ser Asn Arg
36 41 46

Glu Val Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Met Ser Ala Glu Gly Leu
260 265 270
Leu Arg Glu Trp Asn Ala Gly Asn Lys Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly
275 280 285
Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Cys Asn Gly
290 295

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.03.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 09.11.1999

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-123985

(43) 公開日 平成7年(1995)5月16日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	7236-4B		
1/21				
// (C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求	請求項の数4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-279349

(22) 出願日 平成5年(1993)11月9日

特許法第30条第1項適用申請有り 1993年6月15日
(財) 金原一郎記念医学医療振興財団発行の「生体の科学 (第44巻 第3号)」に発表

(71) 出願人 593204502

山口 正義

静岡県静岡市瀬名川1239番地の1

(71) 出願人 390037327

第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(72) 発明者 山口 正義

静岡県静岡市瀬名川1239番地の1

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 レギュカルチンをコードするDNA断片

(57) 【要約】

【構成】 肝細胞質由来のレギュカルチンをコードするDNA断片、当該DNA断片を含有する組換え体DNA及び当該組換え体DNAを保有する形質転換体細胞。

【効果】 レギュカルチンを大量に製造することを可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列で表わされるレギュカルチンをコードする DNA 断片。

【請求項 2】 配列番号 2 で示される塩基配列を有するものである請求項 1 記載の DNA 断片。

【請求項 3】 請求項 1 記載の DNA 断片を含有する組換え体 DNA。

【請求項 4】 請求項 1 記載の DNA 断片を含有する組換え体 DNA を保有する形質転換体細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、臨床検査薬、試薬としての有用性が期待される Ca^{2+} 結合蛋白質であるレギュカルチンをコードする DNA 断片、該 DNA 断片を含む組換え体 DNA 及び該組換え体 DNA を保有する形質転換体細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】 Ca^{2+} による細胞機能調節の主な役割は細胞内代謝に関与する酵素の活性調節にある。

【0003】 従来、 Ca^{2+} がカルモジュリンを介して酵素の活性化を増幅させる機構は知られていた。

【0004】 これに対し、レギュカルチンはラット肝細胞質から単離された新しい Ca^{2+} 結合蛋白質である。レギュカルチンは上記カルモジュリンとは異なり肝臓に顕著に存在する等電点 pI 5.20 の酸性蛋白質であり、その Ca^{2+} 結合定数は $4.19 \times 10^5 M^{-1}$ を示し、6~7 個の高親和性 Ca^{2+} 結合部位を持ち、 α -ヘリックス構造を 34% 含む。レギュカルチンに Ca^{2+} が結合するとレギュカルチンの構造はルーズになるという特徴を有する。また、レギュカルチンは Ca^{2+} による肝臓の酵素の活性化を制御していることが知られており、 Ca^{2+} による細胞内情報伝達系の制御因子としての役割を果たしている。さらに、四塩化炭素肝障害時において肝細胞内のレギュカルチン量の減少とともに血清中に漏洩していることが見出されていることから、肝病態との関係が示唆される。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 このようにレギュカルチンは既存の Ca^{2+} 結合蛋白質と異なる性質を有しており、すでに試薬として市販されているカルモジュリンと同様に、研究用試薬として有用性は高い。また、肝病態との関係が示唆されており、臨床検査薬としても期待される。しかし、レギュカルチンは肝臓からの抽出、精製でのみしか入手できず少量しか得ることができなかった。

【0006】 従って本発明の目的は、レギュカルチンのアミノ酸配列を解明し、これをコードする DNA 断片を得、これを基に、レギュカルチンを遺伝子組換え技術により量産する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 斯かる実情に鑑み、本発明者は鋭意研究を行った結果、ラットの肝臓から mRNA を分離し、これを基に cDNA を得、この塩基配列を解析することに成功し本発明を完成した。

【0008】 すなわち本発明は、レギュカルチンをコードする DNA 断片、当該断片を含有する組換え体 DNA、及び当該組換え体 DNA を保有する形質転換体細胞を提供するものである。

【0009】 本発明の DNA 断片は、例えば遺伝子組換え技術を利用して次の如くして製造される。

【0010】 すなわちラットの肝臓から mRNA を調製し、cDNA ライブラリーを作製する。これを発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させる。得られた蛋白質の中から抗レギュカルチン抗体と反応するクローンをスクリーニングし、陽性クローンから cDNA を抽出すればよい。得られた cDNA は、シーケンサにより塩基配列を分析することができる。

【0011】 詳細には、次の如くして DNA 断片を調製する。まず、ラットから mRNA を抽出する。ラットはウイスター系雄性ラットが好ましく、これから肝臓を摘出し、ホモジナイズする。これを、フェノール等で抽出し、遠心分離、アルコール沈澱等の方法を適宜組合せれば mRNA が得られる。

【0012】 得られた mRNA を鋳型として、逆転写酵素を用い、1 本鎖の cDNA を合成する。この一本鎖 cDNA を新たな鋳型として、DNA ポリメラーゼにより二本鎖の cDNA を得ることができる。

【0013】 二本鎖の DNA は、ファージにパッケージングし、これを大腸菌等に感染させ、培養する。培養後、例えば抗レギュカルチン抗体に結合した分子を色素発色反応によって特異的に染め出すことにより、レギュカルチン cDNA 陽性ブランクを同定することができる。

【0014】 この陽性ブランクを単離し、ヘルパーファージと共に大腸菌等の宿主に感染させ、得られたファージ液をさらに大腸菌等に感染させ、レギュカルチンの cDNA 断片を含有する組換え体 DNA (プラスミド) として宿主細胞内で複製させる。この宿主細胞をアンピシリン含有プレートに植菌し、アンピシリン耐性コロニーを選択すれば、本発明の DNA 断片を含有する組換え体 DNA を保有する形質転換体細胞が得られる。

【0015】 このようにして選択された形質転換体細胞から組換え DNA を採取するには常法により抽出すればよく、得られた組換え DNA から本発明の DNA 断片を切り出すには制限酵素等を用いればよい。

【0016】 かくして得られる本発明 DNA 断片の塩基配列も常法により決定することができる。配列番号 2 に本発明 DNA 断片の塩基配列を、配列番号 1 に当該塩基配列に相当するアミノ酸配列を、配列番号 3 にこの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。この配列をもとに合成化

学的手法により、このような完全な塩基配列あるいはその一部を合成することができる。また、この塩基配列に対応したアミノ酸も合成することができる。合成した全塩基配列あるいはその一部をプローブとしてmRNAの定量、cDNAの分離を行うこともできる。また、既知の組換えDNA技術により、この蛋白質あるいは一部修飾した蛋白質を発現させることもできる。なお、これらはラットに限らずヒトを含めた他の動物種にも応用できる。本発明DNA断片を発現させ、レギュカルチンを生産するには、上記の形質転換体細胞又は当該DNA断片を強力なプロモータを有するベクターに組込んだ組換えプラスミドで形質転換された細胞を栄養培地にて培養し、その培養物から採取すればよい。この場合における培養は、用いる形質転換体細胞の性質に応じて行なわれる。

【0017】

【発明の効果】本発明の組換え体DNAを保有する形質転換体細胞を用いれば、活性の高いレギュカルチンを多量に生産することが可能となる。

【0018】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例に用いた試薬、酵素等はすべて市販のものである。ただし、抗レギュカルチン抗体は精製したレギュカルチンをウサギに免疫し作製したものである。

【0019】実施例1

(RNAの調製) ウイスター系雄性ラット(3週齢)から肝臓を摘出し、グアニジン-イソチオシアネート液(4Mグアニジニウムチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.5%サルコシル、0.1M2-メルカプトエタノール、2M酢酸ナトリウム)でホモジナイズした。これをフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール混液で抽出し、4℃、10,000×gで20分遠心した。水層にイソプロパノールを加え、-20℃で放置し、RNAを沈殿させた。回収した沈殿はジエチルピロカーボネート処理した0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに溶解した。これをオリゴ(dT)セルロースカラムに通し、ポリ(A)+RNAを精製した。

【0020】(cDNAライブラリーの作製) 精製したポリ(A)+RNA(5μg)に50unitのMoloney-Murine Leukemiaウイルス逆転写酵素とオリゴ(dT)₁₈プライマーリンカーを添加し、1本鎖cDNAを合成した。さらに合成した1本鎖cDNAに大腸菌リボヌクレアーゼHとDNAポリメラーゼIを添加し、2本鎖cDNAを合成した。これにEcoRIアダプターを付加し、XhoI、EcoRIで消化したファージ発現ベクター(λZAPII)と連結した。さらにパッケージングエキストラクトを用いてフ

ァージにパッケージングしcDNAライブラリーのファージを作製した。

【0021】(レギュカルチンcDNAクローンの選抜) ラット肝のcDNAライブラリーのファージ約1×10⁶個を大腸菌と混合し20個の寒天プレートに植菌した。42℃で3時間半インキュベートした後、プレートに10mMイソプロピルチオβ-D-ガラクトシドで処理したニトロセルロース膜をのせ、37℃で3時間半インキュベートした。ニトロセルロース膜はブロッキングした後、抗レギュカルチンウサギ血清(×200)と室温で2時間インキュベートした。膜は洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体を加えインキュベートした。これを発色液(0.35mMニトロブルーテトラゾリウム、0.4mM5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート)に浸し発色させ、レギュカルチンcDNA陽性プラークを同定した。

【0022】(プラスミドベクターへのサブクローニング) ファージベクターλZAPIIは、その配列中にプラスミドベクターであるpBluescriptの塩基配列を含み、λZAPIIにクローニングされたレギュカルチンのcDNA断片はこのpBluescriptに挿入されている。また、pBluescriptの両端にはヘルパーファージの複製開始点と終結点が存在している。そこで同定したプラークよりファージを単離し、R408ヘルパーファージとともに大腸菌SUREに感染させ、レギュカルチンのcDNA断片を含むpBluescriptを大腸菌内で合成させ、ヘルパーファージの形で大腸菌体外に放出させた。このファージ液をさらに大腸菌SUREに感染させ、レギュカルチンのcDNA断片を有するプラスミドとして菌内で複製させた。この大腸菌を50μg/mlアンピシリン含有のLBプレートに植菌し、アンピシリン耐性コロニーを選択した。

【0023】(cDNAインサートの塩基配列の決定) Sequenaseシステム(US Biochemical社製)を用いてcDNAインサートの全塩基配列を決定した。すなわちプラスミドDNAをEcoRIで切断し、断片はアルカリ変性処理した後、プライマーを加えアニーリングした。これに³⁵S dCTP、0.1M DTT、Sequenase用酵素液を添加した後4等分し、各々にddATP、ddGTP、ddTTP、ddCTPを加え、37℃5分間インキュベートした。これらはアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーを行ない、塩基配列を読み取った。配列番号3にcDNAインサートの全塩基配列を示す。

5'末側から80番目に翻訳開始コドンATGのAがみられ、977~979番目に終始コドンTAAがみられた。この読み枠に相当する塩基配列をアミノ酸に変換すると合計299個のアミノ酸をコードすることがわかった。得られたアミノ酸配列も配列番号3に示す。これか

ら計算されるレギュカルチンの分子量は33,388であつた。この値は精製したレギュカルチンをSDSポリ
 アクリルアミド電気泳動法により算出した分子量と一致
 した。このレギュカルチンをコードするcDNAの塩基
 配列はEMBLやGenbankのデータベースに登録
 されている塩基配列とは一致せず、既存のものとは異な
 ることがわかった。また、他のCa²⁺結合蛋白質のアミ
 ノ酸配列と比較したところ相同性は低かった(カルモジ
 ユリン, 13.3%; カルビンデン-D28K, 16.*

* 3%; S-100β, 11.0%)。

【0024】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 299

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

```

Met Ser Ser Ile Lys Ile Glu Cys Val Leu Arg Glu Asn Tyr Arg Cys
      5              10              15
Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu Glu Ala Ser Lys Cys Leu Leu Phe Val
      20              25              30
Asp Ile Pro Ser Lys Thr Val Cys Arg Trp Asp Ser Ile Ser Asn Arg
      35              40              45
Val Gln Arg Val Gly Val Asp Ala Pro Val Ser Ser Val Ala Leu Arg
      50              55              60
Gln Ser Gly Gly Tyr Val Ala Thr Ile Gly Thr Lys Phe Cys Ala Leu
      65              70              75              80
Asn Trp Glu Asp Gln Ser Val Phe Ile Leu Ala Met Val Asp Glu Asp
      85              90              95
Lys Lys Asn Asn Arg Phe Asn Asp Gly Lys Val Asp Pro Ala Gly Arg
      100             105             110
Tyr Phe Ala Gly Thr Met Ala Glu Glu Thr Ala Pro Ala Val Leu Glu
      115             120             125
Arg His Gln Gly Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Pro Asp His Ser Val Lys
      130             135             140
Lys Tyr Phe Asn Gly Val Asp Ile Ser Asn Gly Leu Asp Trp Ser Leu
      145             150             155             160
Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Thr Val Asp
      165             170             175
Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Pro Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Thr
      180             185             190
Val Tyr Lys Met Glu Lys Asp Glu Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile
      195             200             205
Asp Val Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala Cys Tyr Asn Gly Gly Arg Val
      210             215             220
Ile Arg Leu Asp Pro Glu Thr Gly Lys Arg Leu Gln Thr Val Lys Leu
      225             230             235             240
Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe Gly Gly Lys Asp Tyr Ser
      245             250             255
Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Met Ser Ala Glu Gly Leu
      260             265             270
Leu Arg Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ile Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly
      275             280             285
Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala Gly
      290             295

```

【0025】

【配列表】

配列番号: 2

50 配列の長さ: 897

配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA
起源

* 生物名：ラット

配列：

```

ATGTCCTCCA TCAAGATTGA ATGTGTTTGA AGGGAGAAGT ACAGGTGTGG GGAGTCCCCT    60
GTGTGGGAGG AGGCATCAAA GTGCTGCTG TTTGTAGACA TCCCTTCAAA GACTGTCTGC    120
CGATGGGATT CGATCAGCAA TCGAGTGCAG CGAGTTGGTG TAGATGCCCC AGTCAGTTCA    180
GTGGCACTTC GACAGTCAGG AGGCTATGTT GCCACCATTG GAACCAAGTT CTGTGCTTTG    240
AACTGGGAAG ATCAATCAGT ATTTATCCTA GCCATGGTGG ATCAAGATAA GAAAAACAAT    300
CGATTCAATG ATGGGAAGGT GGATCCTGCT GGGAGATACT TTGCTGGTAC CATGGCTGAG    360
GAAACCGCCC CAGCTGTTCT GGAGCGGCAC CAAGGGTCCT TGTACTCCCT TTTTCCTGAT    420
GACAGTGTGA AGAAATACTT TAACCAAGTG GATATCTCCA ATGGTTTGGG TTGGTCCCTG    480
GACCATAAAA TCTTCTACTA CATTGACAGC CTGTCCTACA CTGTGGATGC CTTTGACTAT    540
GACCTGCCAA CAGGACAGAT TTCCAACCGC AGGACTGTTT ACAAGATGGA AAAAGATGAA    600
CAAAATCCAG ATGGAATGTG CATTGATGTT GAGGGGAAGC TTTGGGTGGC CTGTTACAAT    660
GGAGGAAGAG TAATTCGCCT AGATCCTGAG ACAGGGAAAA GACTGCAAAAC TGTGAAGTTG    720
CCTGTTGATA AAACAACCTC ATGCTGCTTT GGAGGGAAGG ATTACTCTGA AATGTACGTG    780
ACATGTGCCA GGGATGGGAT GAGCGCCGAA GGTCTTTTGA GGCAGCCTGA TGCTGGTAAC    840
ATTTTCAAGA TAACAGGTCT TGGGGTCAAA GGAATTGCTC CATATTCCTA TGCAGGG    897

```

【0026】

【配列表】

配列番号：3

配列の長さ：1216

配列の型：核酸

20※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

※ 生物名：ラット

```

TGGATGCTGG AGTGTTCCT TTGTCTTCTA TTTTAAAGAT ATCTTGAAAA AAACCTGTCA    60
CTGTCCTTTT CCTGCGACC ATG TCT TCC ATC AAG ATT GAA TGT GTT TTA    109
Met Ser Ser Ile Lys Ile Glu Cys Val Leu
5 10
AGG GAG AAC TAC AGG TGT GGG GAG TCC CCT GTG TGG GAG GAG GCA TCA    157
Arg Glu Asn Tyr Arg Cys Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu Glu Ala Ser
15 20 25
AAG TGT CTG CTG TTT GTA GAC ATC CCT TCA AAG ACT GTC TGC CGA TGG    205
Lys Cys Leu Leu Phe Val Asp Ile Pro Ser Lys Thr Val Cys Arg Trp
30 35 40
GAT TCG ATC AGC AAT CGA GTG CAG CGA GTT GGT GTA GAT GCC CCA GTC    253
Asp Ser Ile Ser Asn Arg Val Gln Arg Val Gly Val Asp Ala Pro Val
45 50 55
AGT TCA GTG GCA CTT CGA CAG TCA GGA GGC TAT GTT GCC ACC ATT GGA    301
Ser Ser Val Ala Leu Arg Gln Ser Gly Gly Tyr Val Ala Thr Ile Gly
60 65 70
ACC AAG TTC TGT GCT TTG AAC TGG GAA GAT CAA TCA GTA TTT ATC CTA    349
Thr Lys Phe Cys Ala Leu Asn Trp Glu Asp Gln Ser Val Phe Ile Leu
75 80 85 90
GCC ATG GTG GAT CAA GAT AAG AAA AAC AAT CGA TTC AAT GAT GGG AAG    397
Ala Met Val Asp Glu Asp Lys Lys Asn Asn Arg Phe Asn Asp Gly Lys
95 100 105
GTG GAT CCT GCT GGG AGA TAC TTT GCT GGT ACC ATG GCT GAG GAA ACC    445
Val Asp Pro Ala Gly Arg Tyr Phe Ala Gly Thr Met Ala Glu Glu Thr
110 115 120
GCC CCA GCT GTT CTG GAG CGG CAC CAA GGG TCC TTG TAC TCC CTT TTT    493

```

9	10
Ala Pro Ala Val Leu Glu Arg His Gln Gly Ser Leu Tyr Ser Leu Phe	
125 130 135	
CCT GAT GAC AGT GTG AAG AAA TAC TTT AAC CAA GTG GAT ATC TCC AAT	541
Pro Asp His Ser Val Lys Lys Tyr Phe Asn Gln Val Asp Ile Ser Asn	
140 145 150	
GGT TTG GAT TGG TCC CTG GAC CAT AAA ATC TTC TAC TAC ATT GAC AGC	589
Gly Leu Asp Trp Ser Leu Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr Ile Asp Ser	
155 160 165 170	
CTG TCC TAC ACT GTG GAT GCC TTT GAC TAT GAC CTG CCA ACA GGA CAG	637
Leu Ser Tyr Thr Val Asp Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Pro Thr Gly Gln	
175 180 185	
ATT TCC AAC CGC AGG ACT GTT TAC AAG ATG GAA AAA GAT GAA CAA ATC	685
Ile Ser Asn Arg Arg Thr Val Tyr Lys Met Glu Lys Asp Glu Gln Ile	
190 195 200	
CCA GAT GGA ATG TGC ATT GAT GTT GAG GGG AAG CTT TGG GTG GCC TGT	733
Pro Asp Gly Met Cys Ile Asp Val Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala Cys	
205 210 215	
TAC AAT GGA GGA AGA GTA ATT CGC CTA GAT CCT GAG ACA GGG AAA AGA	781
Tyr Asn Gly Gly Arg Val Ile Arg Leu Asp Pro Glu Thr Gly Lys Arg	
220 225 230	
CTG CAA ACT GTG AAG TTG CCT GTT GAT AAA ACA ACT TCA TGC TGC TTT	829
Leu Gln Thr Val Lys Leu Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe	
235 240 245 250	
GGA GGG AAG GAT TAC TCT GAA ATG TAC GTG ACA TGT GCC AGG GAT GGG	877
Gly Gly Lys Asp Tyr Ser Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly	
255 260 265	
ATG AGC GCC GAA GGT CTT TTG AGG CAG CCT GAT GCT GGT AAC ATT TTC	925
Met Ser Ala Glu Gly Leu Leu Arg Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ile Phe	
270 275 280	
AAG ATA ACA GGT CTT GGG GTC AAA GGA ATT GCT CCA TAT TCC TAT GCA	973
Lys Ile Thr Gly Leu Gly Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala	
285 290 295	
GGG TAA ACTGCAGCTC TTCCTTGCTG TCAGAAGAAA AAGCTTGAAG ACAACTGAGA	1029
Gly	
ATTAACTGC TGCTCTTCCT TGCTGTCAGA AGAAAAAGCT TGAAGACAAC TGAGAATTAA	1089
GGGAGAGAAA TCAATGAACT TTCATATTGT TTTTAAATG AGGCAGTGAT ATTGACATGG	1149
TTAACTGCT TTAATTTACA CTTTGTATTG GGTGCTGGGG AATAAACCTA AAGCCATGGC	1209
ATATTAA	1216